

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 794 号	論文提出者 田中 翔
論文題目 歯根未完成歯および歯根完成歯を口腔外のマウス背部皮下に移植したときの歯髄内応答の組織学的解析	

歯髄が細菌に感染し、部分的または完全に壊死した場合には歯内治療が必要となる。現在、歯根が完成した永久歯では歯内治療が日常的におこなわれ、高い成功率を得ている。しかし、歯根未完成永久歯の歯内治療は困難である。従来、壊死した歯髄を有する歯根未完成歯の治療にはアペキシフィケーションがおこなわれてきた。これは、根尖部に水酸化カルシウム等の薬剤を貼付することで、根尖を硬組織で閉鎖させる方法であるが、それ以上の歯根の成長は望めない。従って、歯根未完成永久歯にある歯髄の機能を維持することは、継続的な根の発達と根尖の狭窄に不可欠である。また、歯根未完成歯の根尖周囲組織から豊富な血液供給があり、組織の再生に関与する歯乳頭由来幹細胞、歯根膜幹細胞、骨髄幹細胞などの存在を認める。

近年、歯根未完成歯に再生歯内療法 (Regenerative endodontic therapy: RET) をおこなうことにより、歯根象牙質に硬組織が添加されることに加え、歯根が伸長することも報告されている。しかし、RET の治療結果を術前に予測することは困難である。これまで、RET が臨床的に成功したとする報告が散見されるが、現在の RET の治療成績から手技を決定するには未だ根拠が不十分である。例えば、RET とアペキシフィケーションの成績に関する最近のメタアナリシスでは、治療した歯の成功率および生存率の間に有意な差は認めなかった。さらに、実験動物を使用した組織学的研究で、RET をおこなった歯の根管内に形成された組織は、歯髄ではなくセメント質、骨、歯周組織と報告されている。つまり、現在、歯根未完成永久歯の壊死歯髄を治療する技術として、RET を適用することが有益であるかはわからない。RET の最大の目的は、象牙質-歯髄複合体の再生であり、RET を成功させるには、損傷した歯髄組織が硬組織に置き換わる問題点を克服する必要がある。そこで、動物モデルを使用し、象牙質-歯髄複合体の性質を正確に把握することが重要である。これは、現在の RET のプロトコールでは、形成された歯髄あるいは象牙質を組織学的に確認できる手段がないからである。これまでのところ、RET の実験モデルはラットやフェレットなどの実験動物を使用することが多かったが、動物の口腔内は視野が狭く、器具の柔軟性がないため RET や抜髄は困難であり、これが根管治療に関する研究が発展しにくい原因の 1 つではないかと考えられる。現在、ラットとマウスの歯を口腔外で移植する動物実験モデルが存在し、皮下組織は無菌であり、移植された歯は感染の兆候を示さなかったことが報告されている。感染により炎症の惹起を考慮せずに済む異所性移植モデルは、非常に有用で再現性があると考えられる。従って、本研究では、まずは象牙質-歯髄複合体を再生できる RET の技術を開発するための核心となる歯の背部移植モデルを確立することを目的とした。また、マウスを選択した理由としては、サイズがラットの約 10% であるため飼育環境を確保しやすく取り扱いが容易で、かつ高い繁殖率や低コスト、そして、歯根形態の違いによりラットに比べてマウスの方が抜歯にかかる時間は短く、本動物実験モデルとしては実用的である。そして、緑色蛍光タンパク質 (enhanced green fluorescent protein: GFP) を発現する C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウスを使用することで、移植後のレシピエント側の細胞とドナー側の細胞の挙動を観察し、再生された組織が歯周組織などの局所組織由来のものか、骨髄に存在する幹細胞から分化したものを探索する。

II. 材料および方法

本研究は愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認 (AGUD399 号) を得て実施し、実験動物の取扱いは同委員会の指針に沿って行った。動物は 12 時間ごとの明暗サイクルで温度を一定に保った環境下におかれ、自由に飼料や水を摂取した。また、緑色蛍光タンパク質を発現するマウスの利用に対しては、愛知学院大学安全委員会の承認 (承認番号:18-1 号) をもとに実施した。

II-1. 根管長および生理学的根尖孔の計測

この計測には、3週齢の雄性 C57BL/6J マウス (n=6) (Chubu Kagaku Shizai Co., Ltd., Aichi, Japan) を用いた。C57BL/6J マウスに塩酸メデトミジン (0.75 mg / kg; Meiji Seika Pharma., Tokyo, Japan)、ミダゾラム (4 mg / kg; Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan) および酒石酸ブトルファノール (5 mg / kg; Meiji Seika Pharma) を組み合わせた3種混合麻酔液を腹腔内注射して全身麻酔をかけた。まず、マウス下顎第1臼歯の歯根が完成する時期を確認するために、マイクロコンピューター断層撮影法 (micro-CT) (Cosmo Scan GX; Rigaku Corp., Tokyo, Japan) を用いて、3週齢から14週齢までの下顎第1臼歯を撮影した。照射パラメータは4分、90 kV、100 mA、ボクセルサイズは5 μ m とした。軸を標準化した後、分析ソフトウェア 3 by 4 viewer 2011 (Kitasenju Radist Dental Clinic i-View Image Center, Tokyo) を使用して、下顎第1臼歯近心根の根管口から根尖までの長さおよび生理学的根尖孔の直径を測定した。

II-2. マウス抜去歯を用いた背部皮下への移植

3、6および12週齢の雄性 C57BL/6J マウスおよび緑色蛍光タンパク質 (enhanced green fluorescent protein: GFP) を発現する C57BL/6-Tg(CAG-EGFP) マウス (GFP マウス; Chubu Kagaku Shizai Co., Ltd., Aichi, Japan) を使用した (各週齢 n = 25)。まず、C57BL/6J マウスに麻酔をかけ、改良したピンセットを用いて下顎第1臼歯を抜去した。そして、直ちに抜去歯を3週齢の GFP マウスの背部皮下へ移植し、4-0 ナイロン糸で縫合した。同様に、GFP マウスの下顎第1臼歯を抜去し、3週齢の C57BL/6J マウスの背部皮下へ移植した。この際、歯根破折を認めた抜去歯は除外した。

II-3. 組織学的解析

マウス背部皮下へ5週間移植後に、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定をおこない、移植した歯を皮膚ごと摘出した。10%EDTA-2Na (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) で3週間脱灰して、通法に従い、試料をパラフィン包埋した。ミクロトーム (LEICA RM 2125RT, Leica Biosystems, Nussloch, Germany) で5 μ m の厚さで薄切したパラフィン切片をヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色をした。なお、観察および撮影は CCD カメラ (Nikon Digital Sight DS-Fi1; Nikon, Tokyo, Japan) を備えた光学顕微鏡 (Eclipse E800M; Nikon) でおこなった。

II-4. 免疫組織学的解析および骨代謝関連細胞の評価

II-3 と同様の手法で作製した厚さ5 μ m のパラフィン切片を用いて、免疫組織学的解析をおこなった。まず、歯周組織由来の細胞 (セメント芽細胞など) を観察するために免疫組織化学染色をおこなった。パラフィン切片を脱パラフィンおよび上昇エタノール系列で脱水後に蒸留水で水洗した。そして、内因性ペルオキシダーゼ活性除去のために、メタノールで希釈した3%過酸化水素水に室温20分間反応させ、0.05% Tween20 を含むトリス緩衝液 (TBST) で5分間洗浄を2回行った。2.5%ウマ血清 (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) で非特異的反応部位のブロッキングを室温1時間でおこなった。そして、ブロッキング液で希釈した抗 periostin 抗体 (ab14041, 1:800; Abcam, Cambridge, UK) を4 $^{\circ}$ C、12時間で反応させた。TBST で5分間の洗浄を3回おこなった後に、ImmPRESS Reagent, anti-rabbit IgG (Vector Laboratories) で室温1時間反応させた。その後、ImmPACT DAB (Vector Laboratories) にて発色させ、蒸留水で洗浄後、ヘマトキシリンによる核染色を施して封入した。なお、観察および撮影は CCD カメラ (Nikon) を備えた光学顕微鏡 (Nikon) でおこなった。

次に、GFP マウス由来細胞および象牙芽細胞を観察するために蛍光免疫染色をおこなった。パラフィン切片を脱パラフィンおよび上昇エタノール系列で脱水後に蒸留水で水洗し、ブロッッキング後、抗 GFP 抗体 (ab290, 1:1000; Abcam) のみ、あるいは抗 GFP 抗体および抗 nestin 抗体 (NB100-1604, 1:10000; Novus Biologicals, USA) を混和したものを反応させた。2次抗体には Alexa Fluor 488 (ab150073, 1:200; Abcam) および Alexa Fluor 594 (A11042, 1:200; Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) を使用し、室温 1 時間で反応させた。そして対比染色は、 $1 \mu\text{g/mL}$ $4',6\text{-diamidino-2-phenylindole}$ (DAPI; Dojindo, Kumamoto, Japan) を使用した。なお、観察および撮影は蛍光顕微鏡 (KEYENCE, Osaka, Japan) でおこなった。また、骨芽細胞および破骨細胞の存在を確認するために、それぞれアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase: ALP) および酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (Tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) 染色を実施した (Sept. Sapie CO., LTD, Tokyo, Japan)。

III. 結果

術後に創の哆開や出血はなく、周囲に強い炎症所見および感染の兆候を認めなかった。なお、手術後 1 週間で背部の皮膚は治癒した。

III-1. Micro-CT による根管長と根尖孔直径の測定

マウス下顎第 1 臼歯近心根の平均根管長は、3 週齢 $0.94 \pm 0.02 \text{ mm}$ 、6 週齢 $1.42 \pm 0.02 \text{ mm}$ 、8 週齢 $1.58 \pm 0.01 \text{ mm}$ および 12 週齢 $1.67 \pm 0.02 \text{ mm}$ であった。次に、根尖孔の平均直径は、3 週齢 $201 \pm 3 \mu\text{m}$ 、6 週齢 $84.6 \pm 1.2 \mu\text{m}$ 、8 週齢 $64.1 \pm 0.7 \mu\text{m}$ および 12 週齢 $51 \pm 2 \mu\text{m}$ だった。これらの結果は、マウス下顎第 1 臼歯歯根が 8 週齢で完成することを示した。本結果に基づき、3 週齢および 6 週齢のマウスを根未完成歯モデルとして、12 週齢を根完成歯モデルとして使用した。

III-2. 正常な下顎第 1 臼歯の組織学的解析

下顎第 1 臼歯正常像の H&E 染色像を観察した。3、6 および 12 週齢の下顎第 1 臼歯は髓腔全体に血管や象牙前質に沿って配列する連続した象牙芽細胞様細胞を認めた。週齢が増すにつれて歯根は成長し、根尖の狭窄を認め、6 週齢と 12 週齢では根尖部にセメント質の形成が著明に観察された。

III-3. 背部皮下に移植した歯の肉眼所見

移植直後は移植した歯の周囲に血管はなかった。しかし、移植後 5 週間で 3、6 および 12 週齢の移植した歯の周囲に血管が観察された。

III-4. 移植後 5 週間経過した下顎第 1 臼歯の組織学的解析

移植後 5 週間経過した下顎第 1 臼歯の H&E 染色標本を組織学的に観察した。3 および 6 週齢で移植した歯の歯髓壊死の割合は 32% (7/25) であり、12 週齢で移植した歯の歯髓壊死の割合は 68% (18/25) であった。

3 週齢で移植した歯の髓腔には、歯冠部に象牙芽細胞様細胞を認めないが、根管部には象牙前質に沿って配列する象牙芽細胞様細胞が観察された。髓腔内には象牙質に連続して形成される硬組織を認めた。6 および 12 週齢で移植した歯に比べて、内部に存在する細胞は全体的に密であった。また、6 および 12 週齢で移植した歯の髓腔には、象牙前質周囲に細胞の配列や象牙芽細胞様細胞を認めず、3 週齢と比較すると髓腔内の細胞も疎であった。3 週齢と同様に象牙質と連続した硬組織の形成を認めた。なお、3 週齢の根尖は開大したままであったが、6 および 12 週

齢の根尖は狭窄しており、根尖周囲にはセメント細胞が封入された細胞性セメント質が形成されていた。移植後の髓腔内に血管を認めなかったものは歯髓の壊死を示し、硬組織が形成されなかった。

III-5. 免疫組織学的解析および骨代謝関連細胞の同定

①移植した歯の髓腔内を構成する細胞の由来

歯髓を構成する細胞の由来を検討するために GFP マウスと抗 GFP 抗体を使用した。まず、歯根未完成歯モデルとして 3 および 6 週齢を、歯根完成歯モデルとして 12 週齢を使用し、C57BL/6J マウスの下顎第 1 臼歯を GFP マウスの背部皮下組織に移植した (ホスト GFP)。それぞれ 3、6 および 12 週齢において、移植した歯の冠部歯髓を構成する細胞および血管内皮細胞は抗 GFP 抗体に陰性であった。また、根部歯髓では、歯根未完成歯および完成歯に関わらず、歯髓組織を構成する細胞および血管内皮細胞は抗 GFP 抗体に陽性であった。次に 3、6 および 12 週齢の GFP マウスの下顎第 1 臼歯を C57BL/6J マウスの背部皮下組織に移植した (ドナー GFP)。それぞれ 3、6 および 12 週齢において、移植した歯の冠部歯髓を構成する細胞および血管内皮細胞は抗 GFP 抗体に陽性であった。また、根部歯髓では、歯根未完成歯および完成歯に関わらず、歯髓組織を構成する細胞および血管内皮細胞は抗 GFP 抗体に陰性であった。

②ネスチン染色

まず、ポジティブコントロールとして、3 週齢のマウス下顎第 1 臼歯を使用して、髓角を含めた冠部歯髓および根部歯髓の象牙芽細胞がネスチン陽性反応を示すことを確認した。3 週齢の C57BL/6J マウスの下顎第 1 臼歯を GFP マウスに移植した場合 (ホスト GFP)、冠部歯髓の象牙質に面した細胞は抗 GFP 抗体およびネスチン抗体に対してどちらにも陰性であった。しかし、根部歯髓では、象牙質に面した細胞は抗 GFP 抗体および抗ネスチン抗体の二重染色で陽性反応を示した。また、3 週齢の GFP マウスの下顎第 1 臼歯を C57BL/6J マウスに移植した場合 (ドナー GFP) は、冠部歯髓で抗 GFP 抗体に陽性を示したが、抗ネスチン抗体は象牙質周囲で陰性であった。一方、根部歯髓は抗 GFP 抗体に陰性であったが、抗ネスチン抗体は象牙質に沿って陽性を示した。なお、ドナー GFP 群およびホスト GFP 群両方とも、6 および 12 週齢において、象牙質周囲では抗ネスチン抗体は陰性であった。さらに髓腔内に形成された硬組織周囲でもネスチン反応は陰性であった。

③ALP 染色

3、6 および 12 週齢で移植した歯の髓腔内には、ALP 陽性反応を認めた。また、血管周囲にも強陽性反応を示した。ポジティブコントロールとして 12 週齢の下顎第 1 臼歯部の歯槽骨を使用したところ、歯槽骨周囲に ALP 陽性反応を認めた。

④ペリオスチン染色

まず、ポジティブコントロールとして 3 週齢の下顎骨を使用した。歯周靭帯およびセメント芽細胞にはペリオスチン強陽性反応を示したが、歯髓内では陰性であった。本研究では、移植時に抜去歯の歯周靭帯を除去していないため、移植後の歯の周囲にもペリオスチン陽性反応を認めた。また、髓腔内には一部ペリオスチン陽性反応を示す箇所もあったが、根管内に形成された硬組織周囲は陰性であった。

⑤TRAP 染色

まず、ポジティブコントロールとして 12 週齢の下顎第 1 臼歯部の歯槽骨を使用したところ、

TRAP 陽性反応 (赤色に染色) を認めた。3、6 および 12 週齢で移植した歯の髓腔内には、TRAP 陽性反応を認めなかった。また、象牙質や髓腔内に形成された硬組織も同様に TRAP 陰性であった。

IV. 考察

近年、RET が注目されているが、その治療効果を術前に予測することは難しく、また、現在の治療成績を基にそのプロトコルを決定するには早急である。なぜなら、RET のプロトコルを確立するために必要な動物実験モデルが未だに存在しないからである。そこで、本研究では、RET 研究に適した新規動物実験モデルを確立することを目的に、マウス下顎第 1 臼歯を背部皮下へ同種の異所性移植をすることで、移植後のレシピエント側の細胞とドナー側の細胞の挙動を観察し、移植後の歯髓組織における反応を評価した。

これまでに、根未完成歯をラット腹部皮下組織に移植し、その後の歯髓反応を評価した 2 つの研究がある。それらは、移植後、根未完成歯の歯髓腔に硬組織が形成されることを示したが、象牙芽細胞の存在や血管の由来は明らかにされていない。そして、根完成歯におこなう RET のプロトコルを開発するためには、根完成歯の歯髓反応を理解することが重要であるが、これまでの研究では、根完成歯を用いての検討がなされていない。根尖孔径の大きい歯の方が血管は再建しやすいので、根尖孔の直径が歯髓の反応を観察するためには重要な要因となるが、これまでにマウスの歯根の伸長や根尖孔に関する報告はない。そこで、本研究では、まず歯根の成長が完了する時期を決定するために、マイクロ CT でマウスの正常な下顎第 1 臼歯の歯根長と根尖孔の直径を測定した。その結果、歯根の完成時期は 8 週齢だが、根尖部の長さは 8 週齢以降も徐々に伸長することがわかった。組織学的所見では、歯根象牙質の成長が完了した後も継続的にセメント質が形成されることで歯根長の増加が示された。そこで、歯根の発達の程度 (根尖径) が異なる 3 週齢 (根未完成歯)、6 週齢 (根が完成する直前)、および 12 週齢 (根完成歯) のマウスの下顎第 1 臼歯を抜歯し、皮下組織へ同種の異所性移植をおこなった。すると、移植した歯への一時的に遮断された血流は、移植後 5 週間で根完成歯を含むすべてのグループで回復した。この結果は、根完成歯に RET を施術し、成功した臨床例でも示されている。これまでの研究では、根未完成歯の血管再生は根完成歯よりも早く起こるため、RET は根完成歯より根未完成歯の方が適切であると報告されている。本研究では、根完成歯においても歯髓内の血管が再生することを示せたことから、これらの結果は根完成歯でも RET が成功した過去の報告を支持するものである。ただし、5 週間という限定した移植期間のみの結果であり、根尖の大きさによる血管再生の時期を検討できなかったため、今後の研究課題とする。すなわち、本研究結果はマウス抜去歯の背部皮下移植が、その後の歯髓反応を評価できるモデルであることが示唆された。

歯髓の血管の再建は、髓腔内に血管が新生されるか、あるいは歯周組織からの血管と歯髓に元々存在する血管が吻合するかのどちらかであり、GFP マウスを用いてそれらを確認した。C57BL/6J マウスの歯を GFP マウスの背部皮下移植した場合 (ホスト GFP)、根未完成歯および根完成歯に関わらず、根部歯髓の血管内皮細胞は GFP 陽性反応を示したが、冠部歯髓の血管内皮細胞は陰性であった。本研究結果は、歯周組織から侵入した血管と元の歯髓に存在する血管が吻合して血管が再建されることを示唆するものであった。

これまでの研究では、歯の再植あるいは移植をおこなった場合、歯髓に血管が新生された後、歯髓の反応として髓腔内に硬組織が形成されたと報告されている。この報告は髓腔内に再生され

た組織が硬組織であり、歯髄としての生物学的機能がないことを示唆している。本研究でも、以前の研究と同様に2種類の硬組織が歯髄腔に生成され、1つは、冠部歯髄と根部歯髄に象牙質壁に連続した細胞がない層として観察され、もう1つは細胞が封入されたセメント質に類似したものが観察された。そこで、それらの硬組織を組織学および免疫組織学的に解析した。なお、抗ネスチン、およびペリオスチン抗体を用いた免疫染色やALPおよびTRAP染色は、それぞれ象牙芽細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞、および破骨細胞を特定するために使用した。抗ペリオスチン抗体を使用することで、歯髄腔に再生された組織が歯周組織に関係するかどうかを確認できる。以前の研究で、破骨細胞の存在は歯の再植後の歯髄における骨形成の誘導と常に関連しており、TRAP反応を確認することで骨との識別に利用できることを示唆している。本研究で観察された、細胞が封入されていない象牙質壁に連続した硬組織の特性は、ドナーであるマウスの週齢（3、6および12週齢）によって異なっていた。ネスチン陽性細胞は3週齢の移植歯に形成された硬組織表面に存在し、過去の報告と一致していた。しかし、6週齢と12週齢の移植歯に形成された硬組織にはネスチン陽性細胞を認めなかった。さらに、髄腔内の組織はTRAPやペリオスチンには陽性反応を示さなかったが、ALPには陽性反応を示した。これらの結果により、3週齢で移植した歯の根管に形成された無細胞で象牙質に連続した硬組織は象牙質である可能性が示唆された。この硬組織は移植後に残された象牙芽細胞、あるいは歯髄幹細胞が分化した象牙芽細胞によって形成されたと考えられる。

次に、C57BL/6Jマウスの歯をGFPマウスに移植する（ホストGFP）ことにより、ネスチン陽性細胞の由来を検討した。新たに形成された硬組織の周囲の細胞はGFP陽性反応が観察されたことから、末梢血に造血幹細胞が含まれており、GFP陽性細胞が血流を介して髄腔内に入ってきていることが示唆される。つまり、GFP陽性かつネスチン陽性細胞の由来は、以前の研究で示されたように歯髄、歯乳頭、歯周組織などの局所組織からではなく、骨髓に存在する間葉系幹細胞から分化した可能性が考えられる。しかし、間葉系幹細胞から象牙芽細胞への分化メカニズムを明らかにするには、さらなる研究が必要である。

また、髄腔内に形成されたセメント質様の硬組織について検討したところ、ネスチン、TRAPおよびペリオスチン陽性細胞は、硬組織の表面には存在しなかった。この結果は、形成された硬組織が象牙質、骨、およびセメント質のいずれでもないことを示しており、ペリオスチン陽性細胞が歯髄に現れると報告されている以前の研究と矛盾している。しかし、歯髄内におけるペリオスチン陽性細胞の有無は、皮下と抜歯窩の移植部位における違いに起因する可能性もある。一方で、ALP陽性細胞は冠部歯髄と根部歯髄の両方に存在しており、Calcific metamorphosisの関与が示唆される。Calcific metamorphosisは、髄腔への硬組織の沈着を特徴とする外傷に対する歯髄の反応として定義されており、詳細なメカニズムは未だ不明だが、歯髄の神経血管供給の損傷は、このメカニズムに関係していると報告されている。この硬組織を構成する細胞は未分化の血管周囲の細胞、線維芽細胞、象牙芽細胞に由来する細胞である可能性が考えられる。また別の報告では、血管と神経線維の断裂、象牙芽細胞の損傷および損傷後の歯髄変化が、歯髄組織に何らかの反応を誘発し、硬組織の沈着を加速する可能性があることを示している。以上より、冠部および根部歯髄に新たに形成された硬組織は、最終的に石灰化組織になる可能性のあるcalcific metamorphosisである可能性が示唆された。ただし、本研究では移植期間が5週と短いため、形成された硬組織の特性や硬組織を形成する細胞の特徴を今後明らかにするためには、

より長い移植期間が必要である。さらに興味深いことに、*calcific metamorphosis* を形成した可能性のある細胞の由来は、冠部歯髄と根部歯髄で異なっていた。C57BL/6J の背部皮下に GFP マウスの抜去歯を移植したところ (ドナーGFP)、根部歯髄ではなく冠部歯髄においても GFP 陽性反応を示した。この結果は、冠部歯髄に生き残ったドナー由来の細胞やレシピエント由来の細胞が *calcific metamorphosis* を形成細胞に分化することができる可能性があることを示唆する。髄腔内に入るレシピエント側の細胞の由来は本研究では明らかにされなかった。歯髄、歯周組織などの局所組織由来のものではないと推測される。本研究では、最大の目的である歯髄を再生させることができなかった。従って、今後の研究課題は、歯内治療をおこなった後、髄腔内に細胞を移植して歯髄が再生するかどうか検討することである。